

ROYAUME DE BELGIQUE

## BREVET D'INVENTION



MINISTERE DES AFFAIRES ECONOMIQUES

N° 898.664

Classif. Internat.: C07H/C07D

Mis en lecture le:

02 -05- 1984

LE Ministre des Affaires Economiques,

*Vu la loi du 24 mai 1854 sur les brevets d'invention;**Vu le procès-verbal dressé le 12 janvier 19 84 à 15 h. 00**au Service de la Propriété industrielle***ARRÊTE :**

Article 1. - Il est délivré à la Sté dite : REGION WALLONNE représentée par  
L'EXECUTIF REGIONAL WALLON  
Boulevard de l'Empereur 11, 1000 Bruxelles

repr. par Mme M.-P. Botilde c/o Ministère de la Région  
wallonne, Service des Technologies nouvelles  
Place Josephine Charlotte, 3, 5100 Jambes

un brevet d'invention pour: Procédé de préparation du dérivé 5'-O-triphospho-  
ryl-5-(3-allylaminobiotine) uridine et du dérivé 5'-O-tri-  
phosphoryl-2'désoxy-5-(3-allylaminobiotine) uridine

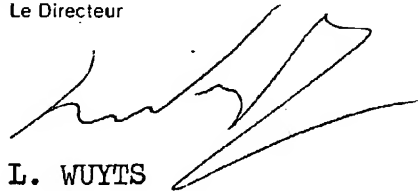
Article 2. - Ce brevet lui est délivré sans examen préalable, à ses risques et périls, sans ga-  
rantie soit de la réalité, de la nouveauté ou du mérite de l'invention, soit de l'exactitude de la  
description, et sans préjudice du droit des tiers.

Au présent arrêté demeurera joint un des doubles de la spécification de l'invention  
(mémoire descriptif et éventuellement dessins) signés par l'intéressé et déposés à l'appui de  
sa demande de brevet.

Bruxelles, le 31 janvier 19 84

PAR DELEGATION SPECIALE:

Le Directeur

  
L. WUYTS

000004

DEMANDE DE BREVET  
D'INVENTION

POUR

"Procédé de préparation du dérivé 5' -0- triphosphoryl - 5 - (3 - allyl-aminobiotine) uridine et du dérivé 5' - 0 - triphosphoryl - 2' - desoxy - 5 - (3 - allylaminobiotine) uridine."

DEPOSEE PAR :

Région wallonne, représentée par l'Exécutif Régional  
Wallon, Boulevard de l'Empereur, 11, 1000 BRUXELLES

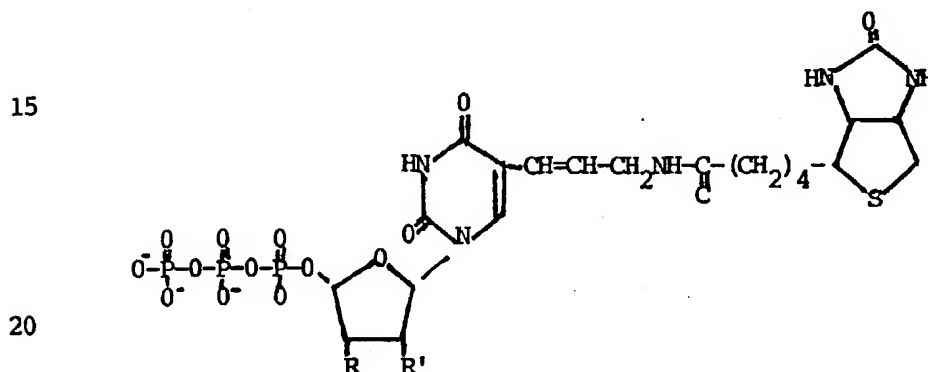
Cette invention a été réalisée à l'Université Libre de Bruxelles, Faculté des Sciences, Département de Biologie moléculaire, rue des Chevaux, 67, 1640 Rhode - Saint - Genèse, Belgique, par Messieurs Alfredo Morais Cravador, Docteur en Sciences, Georges Huez, Chercheur Qualifié FNRS et Madame Marie-José ARIÈS, Licenciée en Sciences Chimiques.

NPB

1 Procédé de préparation du dérivé 5'-0- triphosphoryl -5-  
(3-allylaminobiotine) uridine et du dérivé 5' -0- triphosphoryl  
-2'- désoxy -5- (3-allylaminobiotine) uridine.

5 L'invention concerne un procédé de préparation du dérivé 5'-0-  
triphosphoryl -5- (3-allylaminobiotine) uridine (en abréviation  
Bio-UTP) et du dérivé 5'-0-triphosphoryl -2'-désoxy-5-(3-allyl-  
aminobiotine) uridine, (en abréviation Bio-dUTP) obtenus par un  
procédé de synthèse simplifié.

10 De tels dérivés de la biotine et de l'uridine triphosphate (UTP)  
ou de la désoxyuridine triphosphate (dUTP) sont représentés par  
la formule générale suivante.



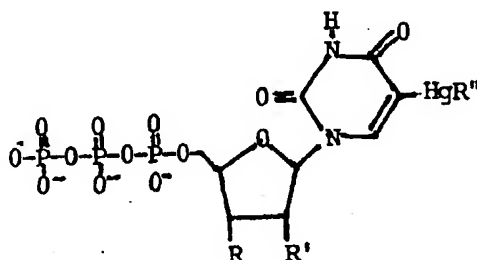
Avec R et R' = OH pour le dérivé de l'uridine et R = OH et R' = H  
pour le dérivé de la désoxyuridine.

25 De tels analogues de nucléotides, (Bio-UTP et Bio-dUTP) qui peuvent  
être utilisés notamment comme marqueurs par incorporation dans des  
polynucléotides, trouvent de nombreuses applications dans les recher-  
ches biomédicales et de recombinaison génétique.

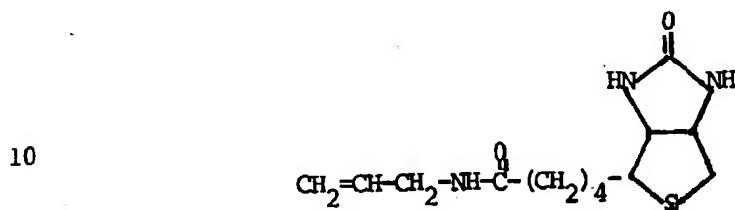
Le procédé de synthèse du Bio-UTP et du Bio-dUTP décrit par P.R.  
Langer, A.A. Waldrop. et D.C. Ward (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.  
30 78, (1981) 6633) fait appel à trois réactions successives.  
Dans une première phase, l'uridine triphosphate (UTP) ou la désoxyuri-  
dine triphosphate (dUTP) est mis en réaction avec de l'acétate mercu-  
rique pour obtenir les dérivés respectifs 5-mercurique de l'UTP ou de  
la dUTP.

35 .

- 1 Dans une deuxième phase, les dérivés mercuriques de l'UTP ou de la dUTP sont mis en réaction avec l'allylamine en présence d'un catalyseur pour obtenir les dérivés 5-allylamino-UTP ou dUTP.
- 5 Ces dérivés doivent être purifiés en deux étapes, d'abord par chromatographie sur colonne DEAE Sephadex, ensuite par chromatographie liquide à haute performance.  
Dans une troisième étape, les produits de réaction de la deuxième phase sont mis en réaction avec l'ester N-hydroxysuccinimide de la biotine pour obtenir respectivement le Bio-UTP et le Bio-dUTP.
- 10 Le produit final est enfin purifié par chromatographie sur colonne de DEAE Sephadex.  
Le schéma de synthèse décrit ci-dessus nécessite 3 réactions et 3 étapes de purification mettant en jeu une fonction triphosphate particulièrement
- 15 labile. Il a des désavantages d'être long, laborieux et sujet à dégradation de par l'instabilité relative des intermédiaires mis en jeu. De plus, les caractéristiques structurales du produit final et du produit de la seconde phase dans le procédé décrit, ne permettent pas une interprétation immédiate en spectrophotométrie UV du
- 20 résultat de la réaction car ces produits ont des spectres UV semblables.  
La présente invention a pour objet de remédier à ces divers inconvénients. Suivant l'invention, on prépare le dérivé 5' -O-triphosphoryl - 5 (3-allylaminobiotine) uridine (Bio-UTP) et le dérivé 5' -O- triphosphoryl -2' désoxy -5- (3-allylaminobiotine) uridine
- 25 (Bio-dUTP) par la réaction, en présence d'un catalyseur, d'un dérivé 5-mercurique de l'uridine triphosphate ou de la 2' -désoxyuridine triphosphate de formule générale (I).

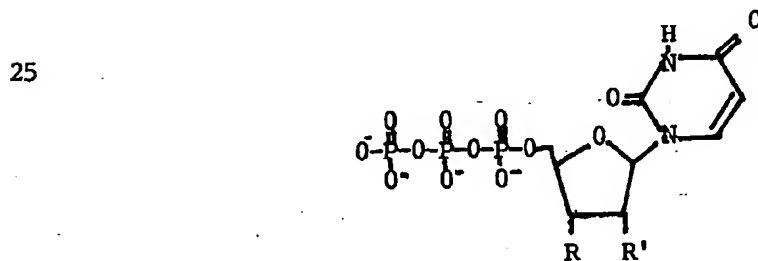


1 dans laquelle R et R' = OH pour le dérivé de l'uridine,  
 R = OH et R' = H pour le dérivé de la désoxyuridine, et R'' = radi-  
 cal choisi parmi l'acétate, le chlorure, le nitrate, le perchlorate,  
 l'acétamide, le trinitrométhane, avec l'allylaminobiotine de formule  
 5 générale (II).



15 L'allylaminobiotine de formule II est mis en réaction avec le dérivé  
 mercurique de formule générale I en présence d'un catalyseur.  
 Le catalyseur est choisi parmi le  $K_2PdCl_4$ ,  $Li_2PdCl_4$ ,  $LiPdCl_3$ ,  
 $Pd(NO_3)_2$ ,  $Pd(OOCCH_3)_2$ . (R.F. Heck, J. Amer. Chem. Soc. 90 (1968)  
 5531).

20 Le composé mercurique de formule générale (I) est obtenu par la réaction  
 de la 5'-O-triphosphoryluridine ou de la 5' -O-triphosphoryl-2'-  
 désoxyuridine de formule générale (III) :



30

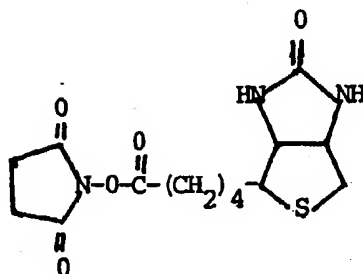
dans laquelle R et R' = OH pour le dérivé de l'uridine et R = OH  
 et R' = H pour le dérivé de la désoxyuridine, avec un composé mer-  
 curique choisi parmi l'acétate, le chlorure, le nitrate, le perchlo-  
 35 rate, l'acétamide, et le trinitrométhane mercuriques.

La réaction est réalisée dans un milieu tamponné à 50°C.

Le produit de la réaction est isolé par extraction et précipitation.

1 L'allylaminobiotine de formule générale II est obtenue par la  
réaction de l'ester N-hydroxysuccinimidique de biotine de formule  
générale (IV).

5



10

avec l'allylamine.

15 (J. Becker, M. Wilchek and E. Katchalski (1971) Proc. Natl. Acad.  
Sci. USA 68, 2604).

L'exemple donné ci-après, qui ne limite en rien le procédé de  
synthèse faisant l'objet de la présente invention, permettra de  
mieux comprendre l'invention.

20 L'exemple donné se réfère à l'obtention du Bio-dUTP.

Préparation du dérivé 5-mercurique de la dUTP.

On agite, par exemple, 4 h à 50°C une solution aqueuse d'acétate de  
sodium 0.1 M, pH 6, de désoxyuridine triP 10 mM, d'acétate mercuri-  
que 50 mM. On ajoute du chlorure de lithium jusqu'à une concentration  
25 de 0.17 M. La solution est extraite avec de l'acétate d'éthyle. La  
phase aqueuse est précipitée avec de l'éthanol. Le précipité est  
lavé avec de l'éthanol et avec de l'éther diéthylique.

Préparation de l'allylaminobiotine.

A une solution de N-hydroxysuccinimidebiotine (45mg, 0,13 mmol)  
30 dans la diméthylformamide anhydre (0,5 ml), on ajoute l'allylamine  
(15 mg, 0,26 mmol). La solution est agitée pendant 2h à 20°C, puis  
concentrée sous vide. Le résidu est recristallisé dans l'isopropa-  
nol-éther anhydres.

On a obtenu 35 mg de cristaux incolores.

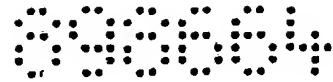
35 F : 162 - 163°C



1 Préparation du 5' -O-triphosphoryl (-5-allylaminobiotine)  
désoxyuridine

A une solution d'allylaminobiotine (2 mg, 0,01 mmol) dans  
1 l'acétate de sodium aqueux (0,1 M, pH 5, 0,8 ml) on  
5 ajoute le dérivé 5-mercurique de la 2' -désoxyuridine  
triphosphate (I) (5 mg, 0,01 mmol) et ensuite le tetra-  
chloro palladate de potassium (2,3 mg, 0,01 mmol) en  
suspension dans 50 µl d'eau. Le mélange est agité 11 h  
à 20°C, filtré sur milipore ou centrifugé. Le surnageant  
10 est déposé sur une colonne de Sephadex DEAE A25 de 2,5 ml  
et élué dans un gradient linéaire 0,1 M à 0,9 M de bicar-  
bonate de triéthylammonium (TEAB, pH 7,5).  
Le produit éluant en fin de gradient présente le spectre  
UV attendu ( $\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{min}} = 265 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{max}} = 275 \text{ nm}$   
15 dans l'eau) et une pureté de  $\geq 90\%$  d'après analyse par HPLC.  
Le dérivé ainsi obtenu a été introduit dans du DNA corres-  
pondant au gène de globine par nicktranslation. Le DNA  
ainsi substitué réagit avec l'avidine fixée fixée sur  
colonne d'ultragel avec la même efficacité que le produit  
20 obtenu par la méthode antérieurement connue, décrite dans  
l'article de P.R. Langer et al. (Proc. Nat. Acad. Sci.  
USA 78 (1981) 6633).  
La même procédure de synthèse peut être utilisée pour  
l'obtention du Bio-UTP.  
25 Comme avantages du procédé nouveau de synthèse faisant  
l'objet de la présente invention citons :  
- la rapidité et la simplicité ;  
- la diminution des risques de dégradation des dérivés  
triphosphorylés qui ne sont engagés qu'une seule fois  
30 dans une réaction et une fois dans une étape de purification ;  
- l'obtention, après mercuration en une étape, d'un produit  
final dont la structure permet une purification aisée en  
une seule étape par chromatographie sur colonne de Sephadex  
- l'identification facile du produit final car sa structure  
35 électronique caractéristique se différencie aisément par  
spectrophotométrie UV de celle du produit de départ.

11/83



- 6 -

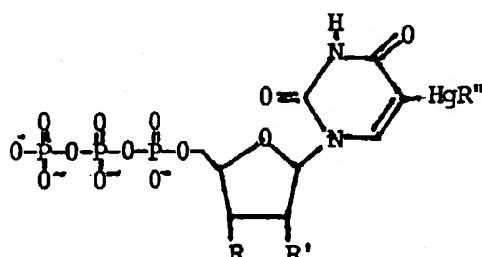
- 1 Les dérivés 5' -O-triphosphoryl -5- (3-allylaminobiotine) uridine et 5' -O- triphosphoryl -2'-désoxy-5-(3-allylaminobiotine) uridine obtenus sont utilisés, notamment comme marqueurs internes des acides nucléiques.
- 5 Des possibilités d'applications sont, par exemple, l'isolement ou la mise en évidence d'un RNA d'une espèce bien définie dans une population hétérogène de RNA, ou la mise en évidence de séquences de RNA ou de DNA par hybridation in situ ou après transfert de ces molécules sur filtre de nitrocellulose (Southern blot ou Northern blot), ou encore l'isolement de RNA spécifiques de protéines induites.
- 10

NPB



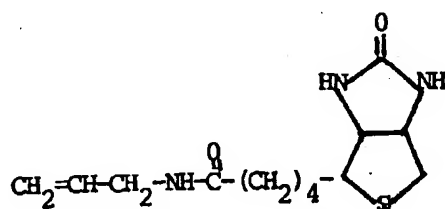
Revendications

- 1 1. Procédé de préparation du dérivé 5' -O-triphosphoryl -5-  
(3-allylamino biotine) uridine et du dérivé 5' -O-triphosphoryl  
-2'-désoxy-5-(3-allylamino biotine) uridine, caractérisé par la  
réaction, en présence d'un catalyseur, d'un dérivé 5-mercurique  
5 de l'uridine triphosphate ou de la désoxyuridine triphosphate de  
formule générale I :



- dans laquelle R et R' = OH pour le dérivé de l'uridine, R = OH  
15 et R' = H pour le dérivé de la désoxyuridine et R'' = radical  
choisi parmi l'acétate, le chlorure, le nitrate, le perchlorate,  
l'acétamide, le trinitrométhane, avec l'allylaminobiotine de  
formule générale : II :

20

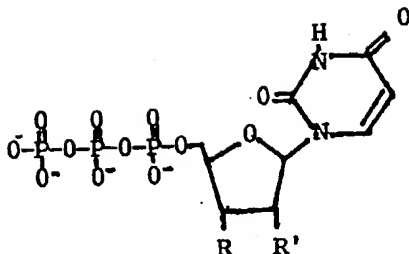


25

2. procédé de préparation du dérivé 5' -O-triphosphoryl -5-  
(3-allylamino biotine) uridine et du dérivé 5' -O- triphosphoryl  
-2'-désoxy -5- (3-allylamino biotine) uridine suivant la reven-  
dication 1, caractérisé en ce que le composé de formule  
générale I est obtenu par la réaction de la 5' -O- triphosphryl-  
30 2'-désoxyuridine de formule générale :

1

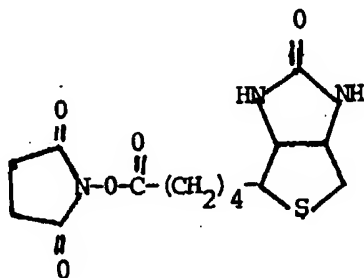
5



10 dans laquelle R et R' = OH pour le dérivé de l'uridine et R = OH  
et R' = H pour le dérivé de la désoxyuridine, avec un composé  
mercurique choisi parmi l'acétate, le chlorure, le nitrate, le  
perchlorate, l'acétamide, et le trinitrométhane mercuriques.

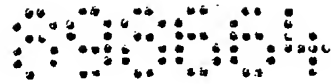
15 3. Procédé de préparation du dérivé 5' -0- triphosphoryl -5- (3-allyla-  
minobiotine) uridine et du dérivé 5' -0- triphosphoryl -2'- désoxy  
-5- (3-allylaminobiotine) uridine suivant les revendications 1 et 2,  
caractérisé en ce que le composé de formule II est obtenu par la  
réaction de l'ester N-hydroxysuccinidique de biotine de formule  
20 générale :

25



30

avec l'allylamine.



- 9 -

- 1 4. Procédé de préparation du dérivé 5' -0- triphosphoryl -5- (3-allyl-aminobiotine) uridine et 5' -0- triphosphoryl -2'- désoxy -5- (3-allylaminobiotine) uridine, suivant la revendication 1 caractérisé en ce que le catalyseur est choisi parmi le  $K_2 PdCl_4$ ,  $Li_2PdCl_4$ ,  
5  $LiPdCl_3$ ,  $Pd (NO_3)_2$ ,  $Pd (OOCH_3)_2$ .
5. Dérivé 5' -0-triphosphoryl -5- (3-allylaminobiotine) uridine et 5' -0- triphosphoryl -2' - désoxy -5- (3-allylaminobiotine) uridine, obtenus suivant les revendications 1 à 4, caractérisés en ce qu'ils sont utilisés comme marqueurs internes des acides nucléiques.

Bruxelles, le 12 janvier 1984

*M.P. Botilde*  
M.P. BOTILDE

Par procuration.